

Evolução do Gene,

Processamento de RNA

E RNA interferência

Para esta aula, parte pode ser encontrada nos Capítulo 6 do livro Molecular Biology of the Cell, Alberts et al,
<https://archive.org/details/MolecularBiologyOfTheCell5th/page/n23/mode/2up>

Exon shuffling page 257 chapter 4

siRNA e RNA editing pages 480-499- chapter 7

FALANDO DE EVOLUÇÃO:

Mutações aumentam a variabilidade genética:

Quais são os principais tipos de mutações?

Substituições de base,

Inserções e Deleções

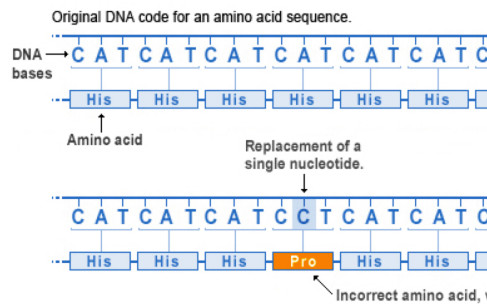
Alterações cromossômicas

Inversões cromossômicas

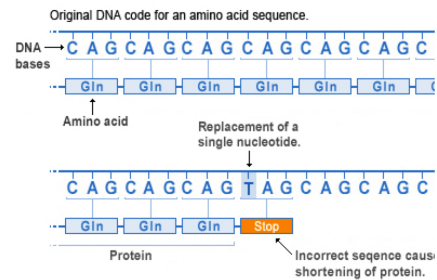
Alteração de número de cromossomos.

Substituições de base: MISSENSE e NONSENSE

Missense mutation



Nonsense mutation



Qual a gravidade de cada uma dessas mutações nas proteínas?

Uma troca de aminoácido pode afetar a proteína?

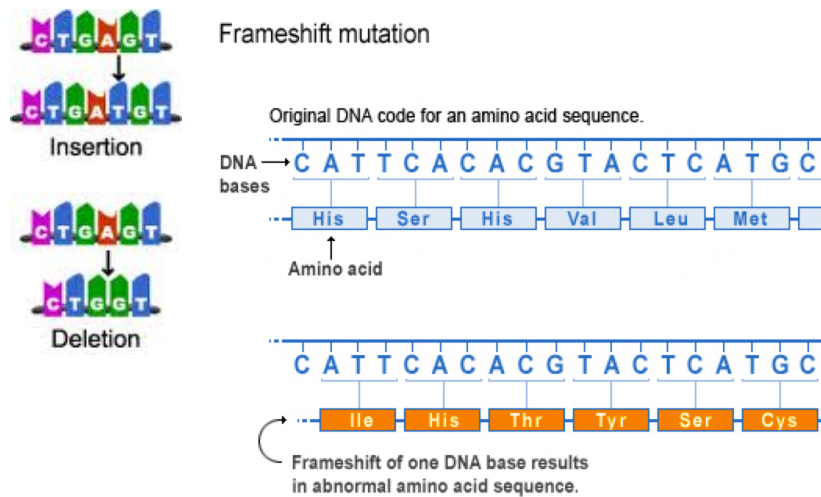
E o que pode ocorrer se a mutação estiver no terceiro Nucleotídeo de um códon?

Código genético é universal e degenerado.

	U	C	A	G	
5' Primeira Base	UUU } Fenil-alanina UUC } UUA } Leucina UUG }	UCU } Serina UCC } UCA } UCG }	UAU } Tirosina UAC } UAA } Stop codon UAG }	UGU } Cysteine UGC } UGA } Stop codon UGG } Tryptophan	3' Terceira Base
	CUU } Leucina CUC } CUA } CUG }	CCU } Prolina CCC } CCA } CCG }	CAU } Histidina CAC } CAA } Glutamina CAG }	CGU } Arginina CGC } CGA } CGG }	
	AUU } Isoleucina AUC } AUA } AUG } Metionina start codon	ACU } Treonina ACC } ACA } ACG }	AAU } Asparagina AAC } AAA } Lisina AAG }	AGU } Serina AGC } AGA } Arginina AGG }	
	GUU } Valina GUC } GUA } GUG }	GCU } Alanina GCC } GCA } GCG }	GAU } Ácido Aspártico GAC } GAA } Ácido Glutâmico GAG }	GGU } Glicina GGC } GGA } GGG }	

Mutação SILENCIOSA!! Por que?

Inserções e deleções de alguns nucleotídeos!



o que acontece se a inserção for de três nucleotídeos?

Inserções e deleções!

Mas o frameshift em geral leva a proteína truncada!

(a) Fase de leitura de códons em triplete com um códon de início ATG e um códon de parada TAG

ATG TCC AGT AGG GTA AGT TAC ATG CGAGCTTTT AGT TCC TAC GAGGTA AGT CCT CATAGGGAGGTAAGTCCC TAG
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Met Arg Ala Phe Ser Ser Tyr Glu Val Gly Pro His Arg Glu Val Ser Pro Parada

Sítio de deleções
e inserções em (b)

(b)

-1 Deleção (-A) ATG TCC AGT AGG GTA AGT TAC TGC GAG CTT TTA GTT CCT ACG AGG TAA GTC CTC ATA GGGAGGTAA GTC CCT AG
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Cys Glu Leu Leu Val Pro Thr Arg Parada

-2 Deleção (-AT) ATG TCC AGT AGG GTA AGT TAC GCGAGCTTT TAG TTC CTA CGAGGT AAGTCC TCA TAG GGAGGT AAGTCC CTA G
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Ala Ser Phe Parada

+1 Inserção (+C) ATG TCC AGT AGG GTA AGT TAC CAT GCGAGCTTT TAG TTC CTA CGA GGT AAGTCC TCA TAG GGAGGT AAGTCC CTA G
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr His Ala Ser Phe Parada

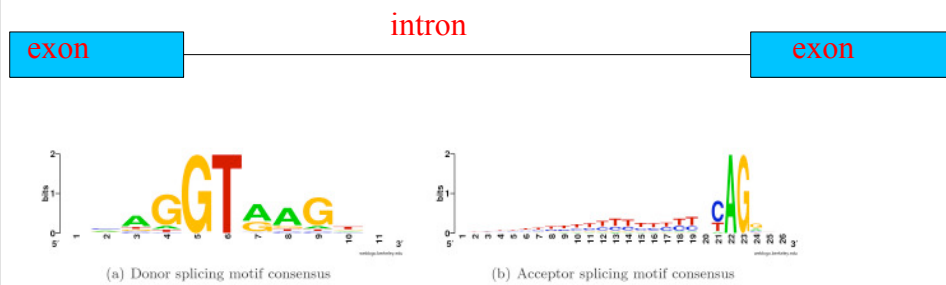
+2 Inserção (+CG) ATG TCC AGT AGG GTA AGT TAC CGA TGC GAG CTT TTA GTT CCT ACG AGG TAA GTC CTC ATA GGGAGGTAA GTC CCT AG
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Arg Cys Glu Leu Leu Val Pro Thr Arg Parada

E mutações nos introns, podem afetar o gene????

Sinais conservados nos introns:

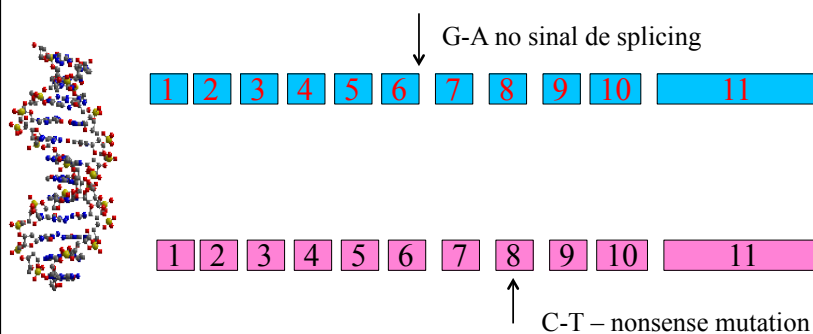
A 3'do exon

a 5'do exon

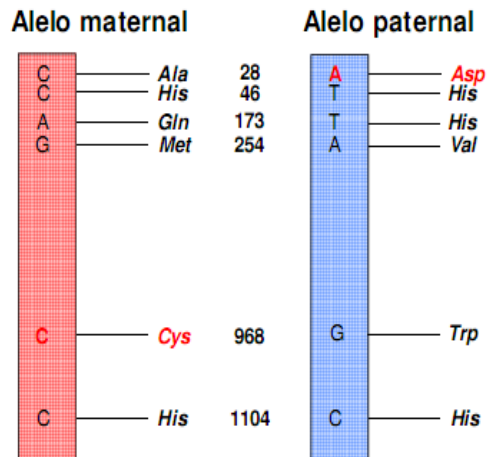


E por que os introns são menos conservados?

Em uma população de Goiás encontramos duas Mutações germinativas no gene XPV!!



Qual o efeito de mutações no sinal de splicing?



Pacientes xeroderma pigmentosum brasileiros-

E essas outras mutações no gene *XPG*.... O que são?

Mutações aumentam a variabilidade genética:

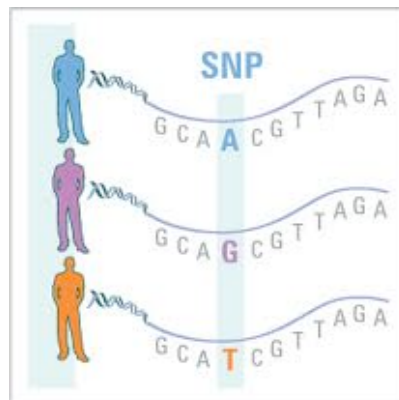
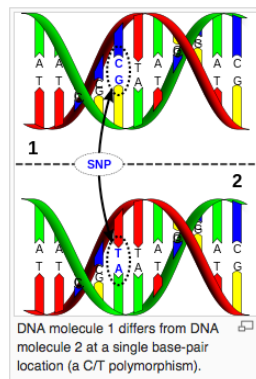
Single nucleotide polymorphism (SNP)-

São cerca de 3 milhões no genoma!!!!

(qual o tamanho de nosso genoma?)

20-30.000 em um exoma...

(em um exoma brasileiro encontramos 3000 novos- não descritos!).

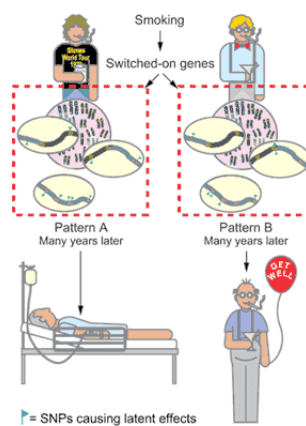


SNPs... o que eles podem nos dizer?

Representam nossa diversidade?

Nossas diferentes respostas em doenças???

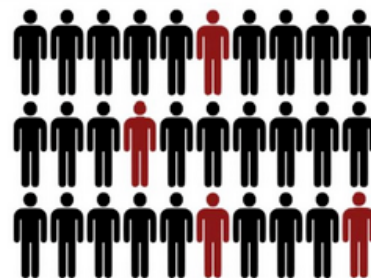
Genetic Variations: Latent Effects



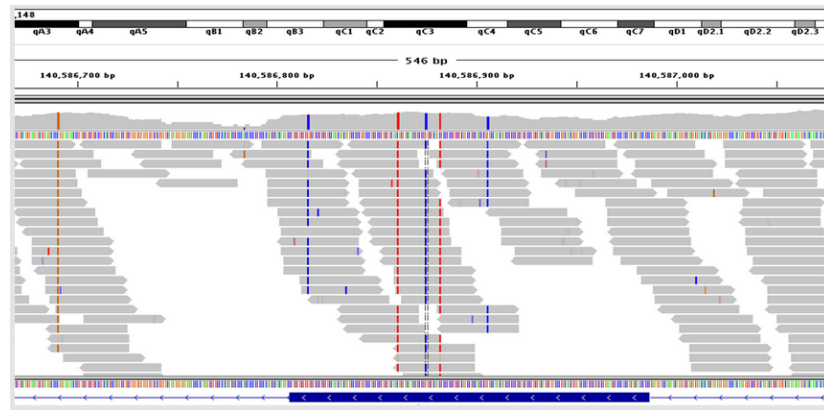
SNPs...e as associações de SNPs com doenças permitem entender melhor nossos riscos!

A

TTGGCCAGCTGGA**C**GAGGGCGATGAC
TTGGCCAGCTGGA**T**GAGGGCGATGAC



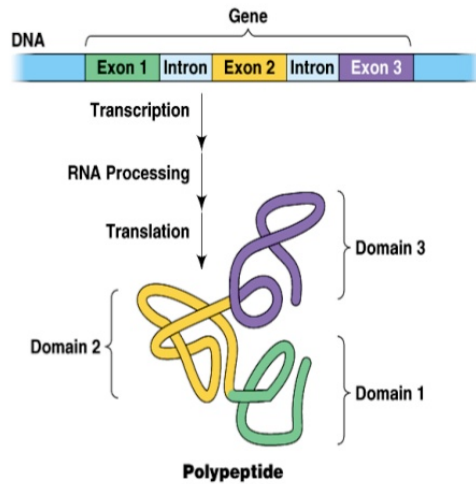
Detectando SNPs por NGS:



Construindo novas proteínas
durante a evolução por

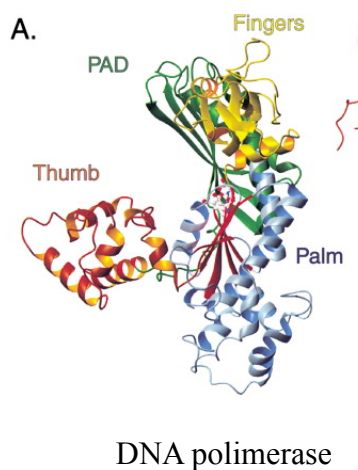
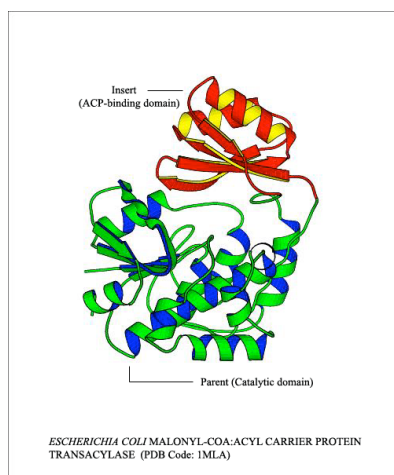
EXON SHUFFLING

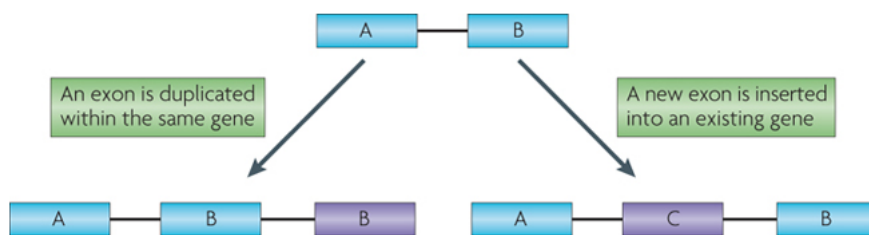
(embaralhamento de exons)



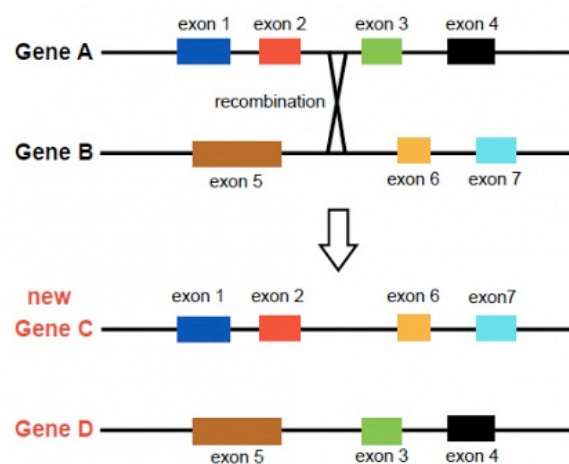
Mas as proteínas são feitos de pedaços (domínios) e em geral codificadas por exons independentes!!!!
O Que isso significa em termos e evolução e criação de novos genes?

Domínios proteicos... o que são?
e qual sua relação com a evolução das proteínas:

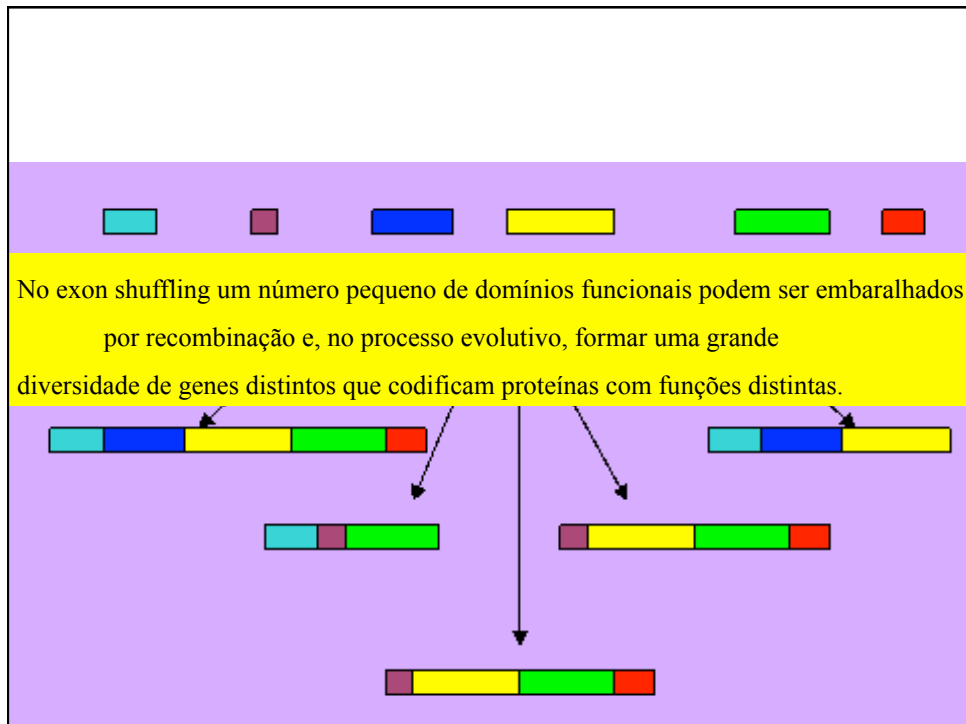




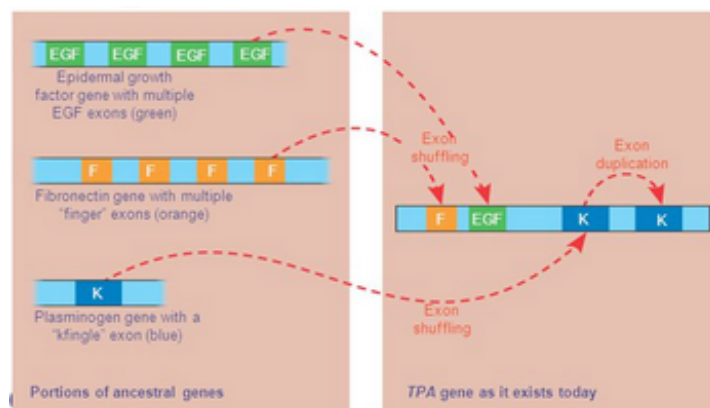
Os exons podem ser embaralhados (exon shuffling) e produzir novas proteínas!!!



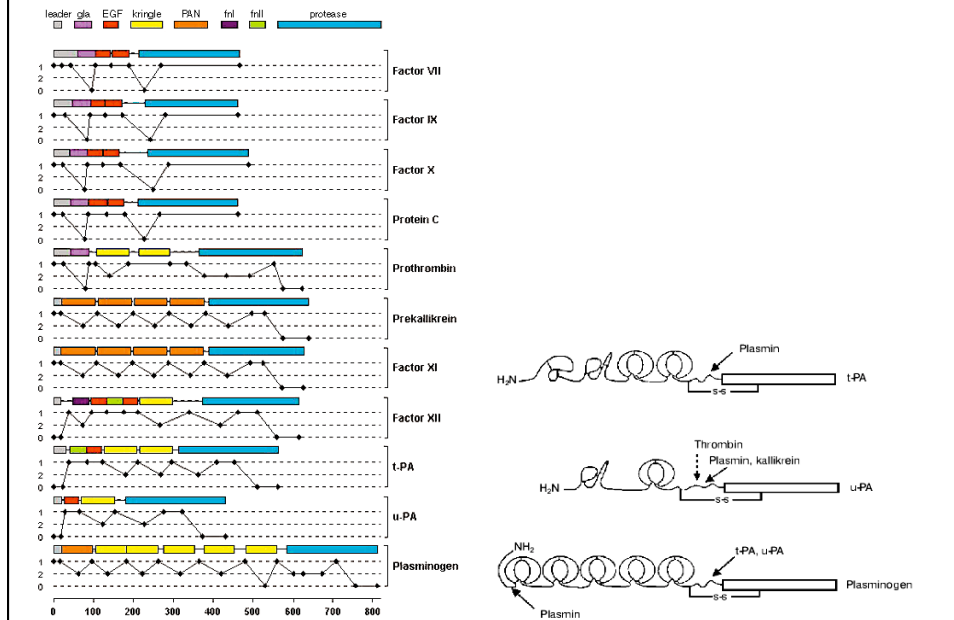
Os exons podem ser embaralhados (exon shuffling) e produzir novas proteínas!!!



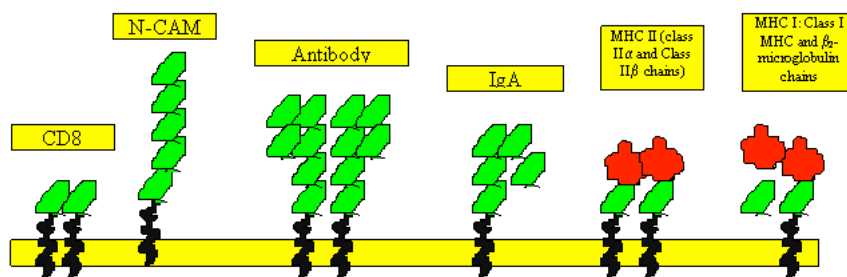
Assim, os domínios proteicos podem funcionar como peças de LEGO e montar proteínas diferentes através de recombinações nos introns!!!!



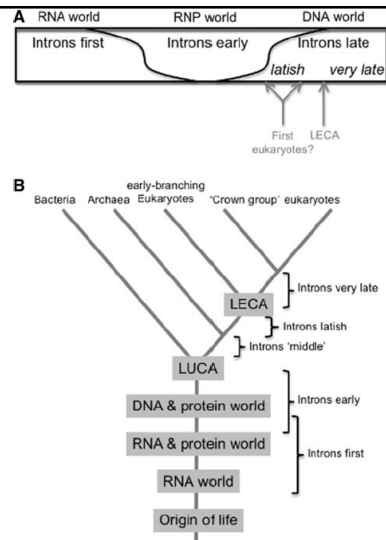
Domínios na montagem de proteínas: exemplos:



Outros exemplos de proteínas com domínios homólogos!!!! Genes do sistema imunológico!



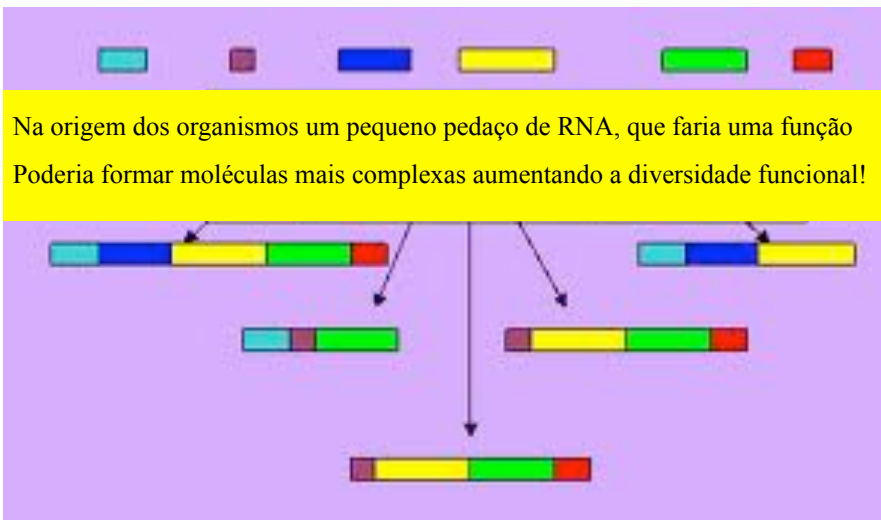
<https://www.youtube.com/watch?v=rMa3i8xz5nU>



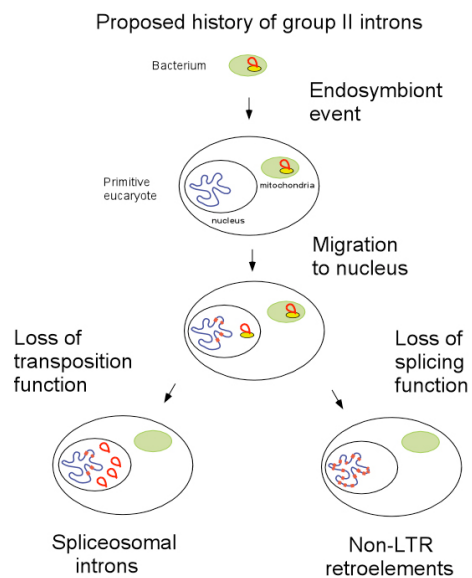
**Se os exons/introns são tão importantes na formação de proteínas,
Certamente tem muito impacto na evolução?
Há quanto tempo os organismos vivos tem introns em seus genes!!!!**

**Os introns são basicamente conservados onde existem em eucariontes..
teriam existido introns nos genes do progenota?**

**Ou no mundo de RNA? –INTRON EARLY HYPOTHESIS
(alguns autores defendem: Intron First hypothesis)**

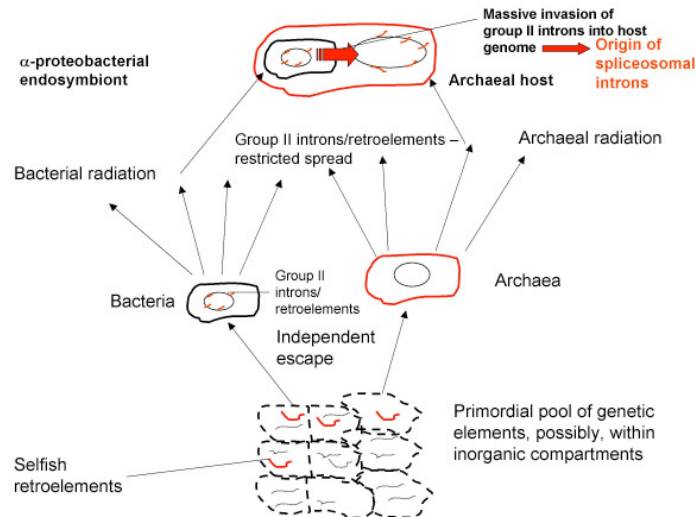


Ou os introns teriam surgido pela infestação de transposons depois que já existiam eucariontes???
INTRON LATE HYPOTHESIS!



Essa infestação pode ter surgido durante a formação de organelas, pela teoria endossimbiontica.

INTRON LATE HYPOTHESIS!

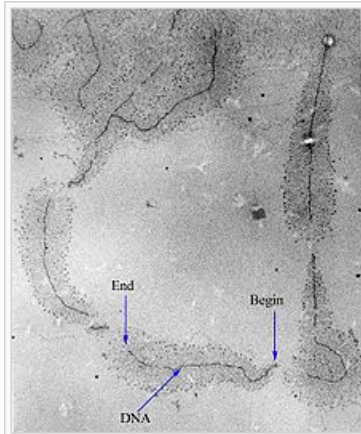


Objetivos da aula:

Como o RNA é processado em eucariontes e RNA não codificantes

1. Eucariontes tem 3 RNA polimerases.
2. 5'CAP e poli-adenilação de mRNA.
3. Introns "self splicing"- Ribozimas
4. Spliceossomos e sua origem.
5. Transporte do RNA ao Citoplasma.
6. RNA não codificador.
7. RNA interference e miRNA
8. RNA editing

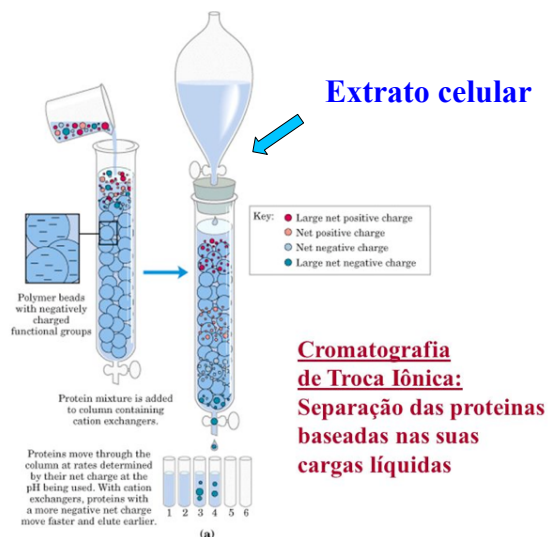
Quantas RNA polimerases existem em bactérias!



RNAP from *T. aquaticus* pictured during elongation. Portions of the enzyme were made transparent so as to make the path of RNA and DNA more clear. The magnesium ion (yellow) is located at the enzyme active site.

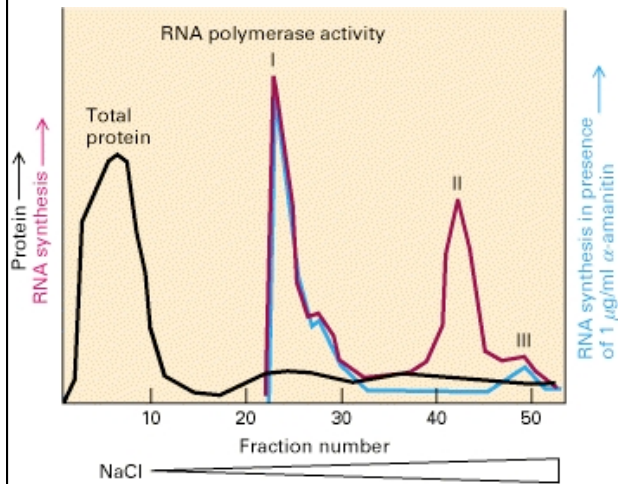
Apenas uma RNA polimerase!

Como purificar a RNA polimerase de eucarionte?



- O que é cromatografia de troca iônica?
- Como medir a atividade de RNA polimerase?

**Vejam os resultados da eluição:
QUANTAS RNAs Polimerases temos em
Eucariontes?**



**Alfa amanitina (azul) inibe síntese de RNAm! Que
enzima sintetiza RNA mensageiro?**

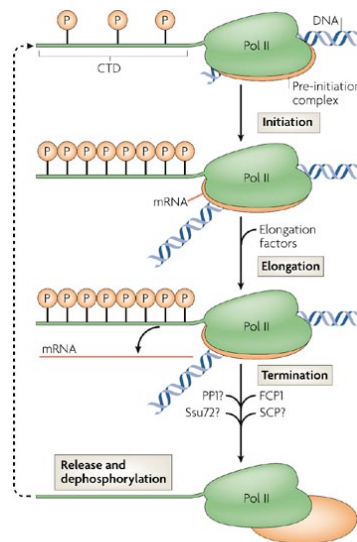
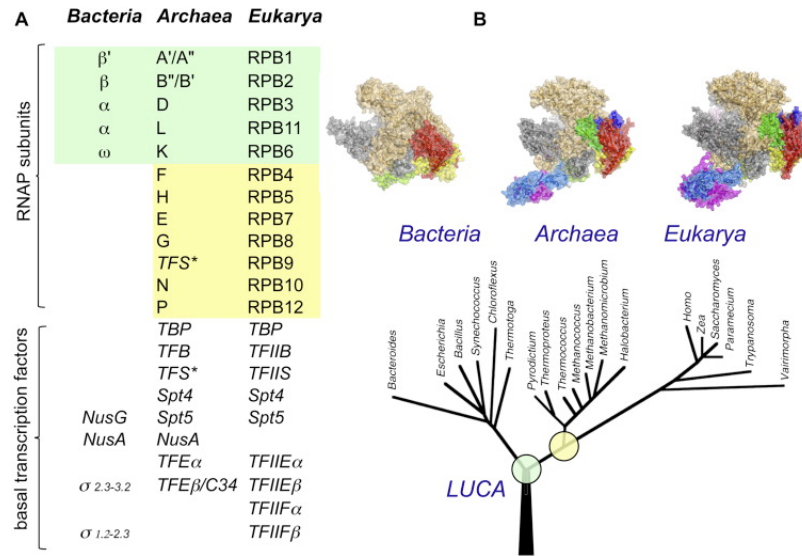
**Três RNA polimerases transcrevem
o RNA em eucariontes!**

RNA polimerase I- RNA ribossômico- RNAr

**RNA polimerase II- RNA mensageiro- RNAm
(microRNA também)**

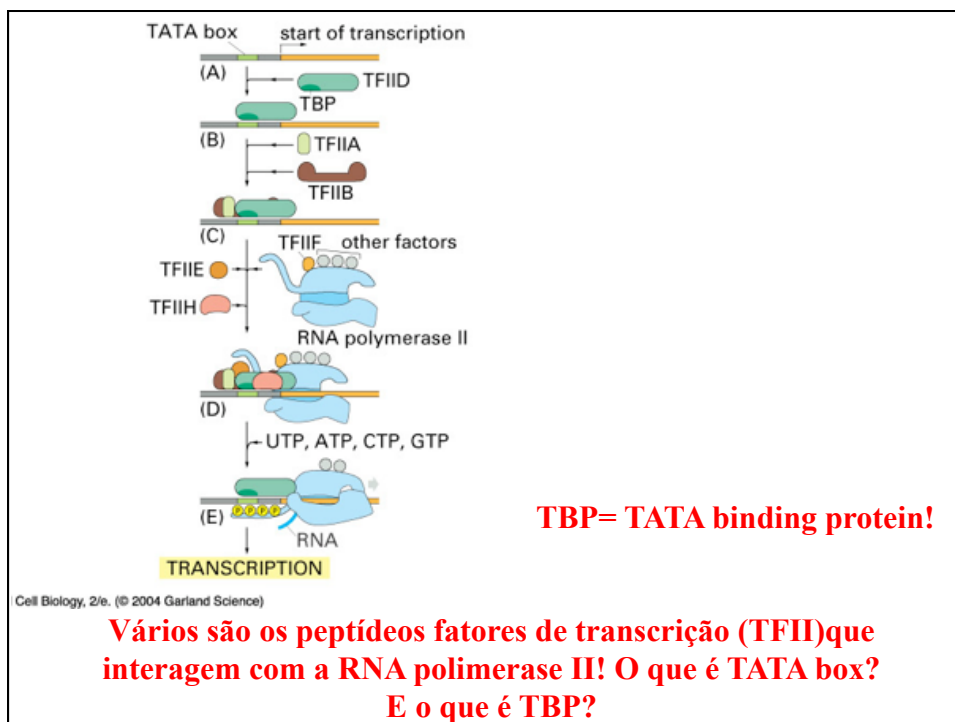
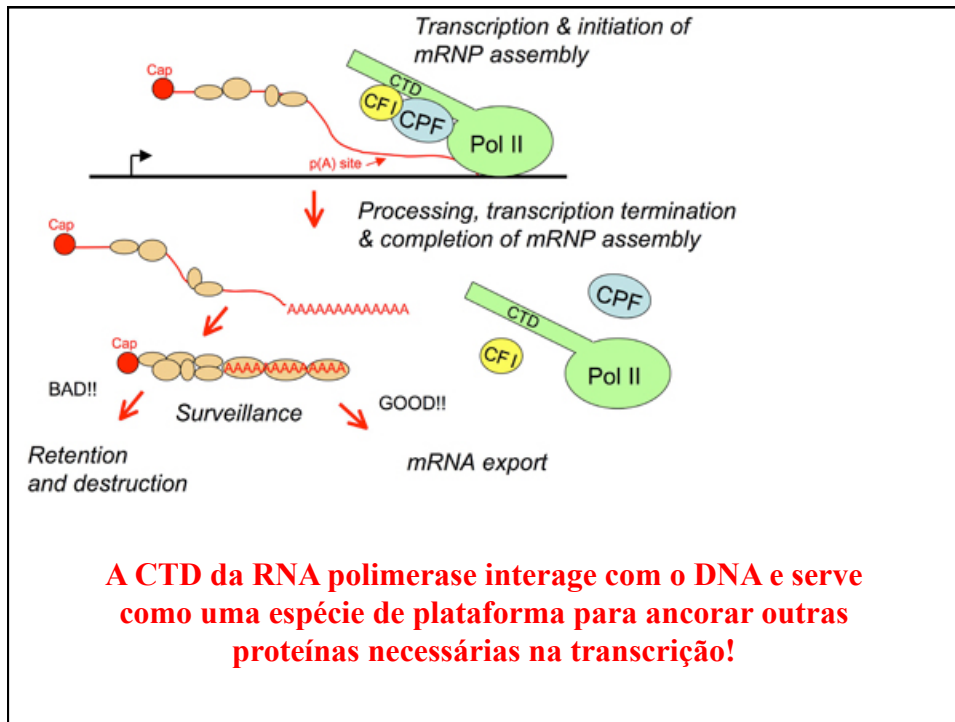
**RNA polimerase III- RNA transportador e outros RNAs
pequenos (RNAr 5S, 7S RNA, etc).**

**As RNA polimerases são altamente conservadas!
Compare eucaria/arquéia e bactéria! Quem são
as mais próximas?**

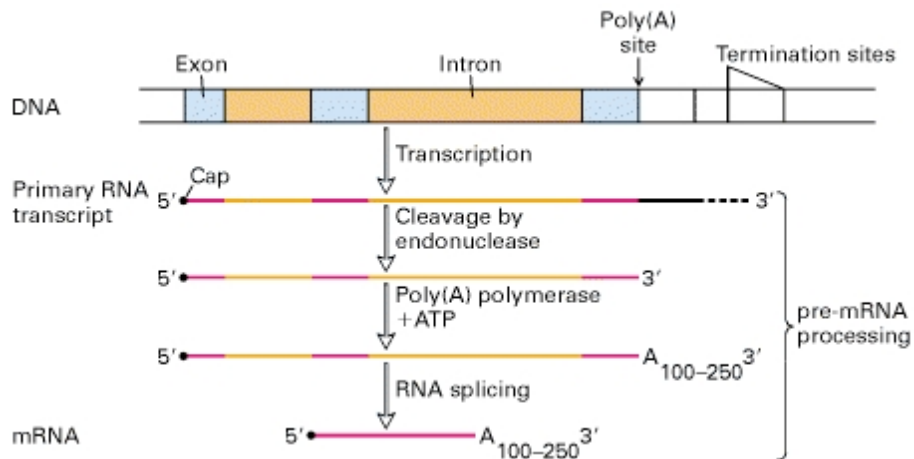


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

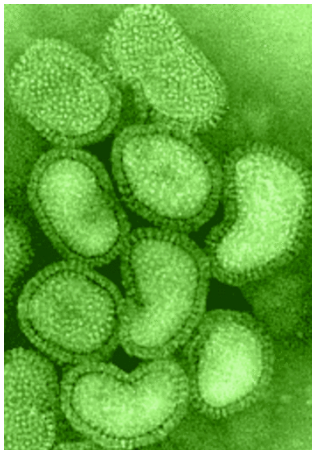
**A RNA polimerase II tem uma cauda (CTD- carboxy terminal domain)
que é fosforilada durante a transcrição!
52 repetições da sequência Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser**



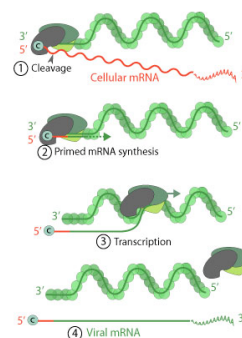
Modificações do RNA na célula (a CTD da RNA polimerase II participa de todos os processos)



Por que os vírus da gripe (genoma RNA negativo) tem replicação nuclear???

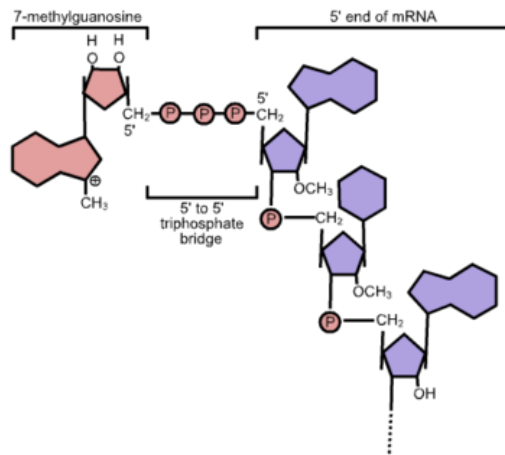


Cap snatching

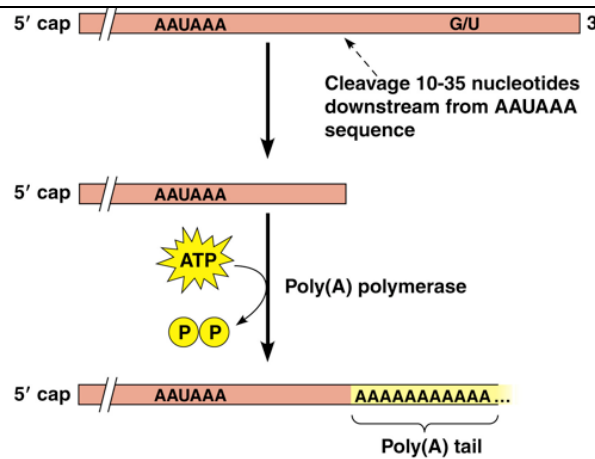


Rouba 5'cap do RNAm da célula hospedeira!

Estrutura do 5'CAP!



Após a clivagem do poliA, o RNA continua a ser transcrito, mas sem 5'CAP é degradado!

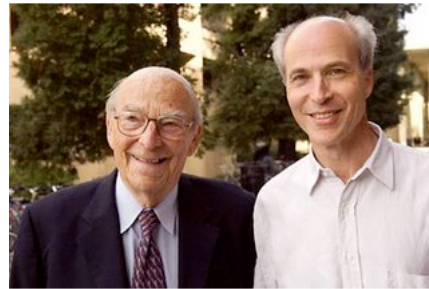
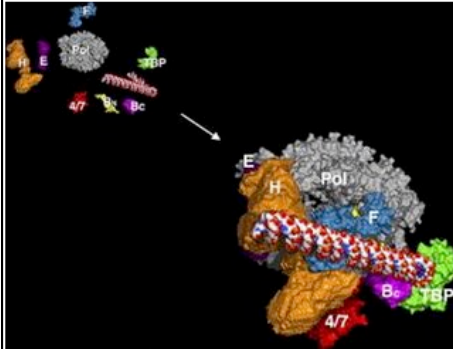


RNAs virais e celulares (mensageiros) tem cauda de poli-A! (exceto RNAm de histonas!!!! Por que? Qual a função de Poli-A?)

Mutações na sequência sinal (AAUAAA) fazem com que o RNAm

não seja poliadenilado e seja degradado!

Prêmio Nobel de Química 2006 Roger Kornberg (aqui com seu pai Arthur- prêmio Nobel em 1959!)



The high resolution of the RNA pol II structure and function!

Video:

<https://www.youtube.com/watch?v=XzVXhemtwmA>

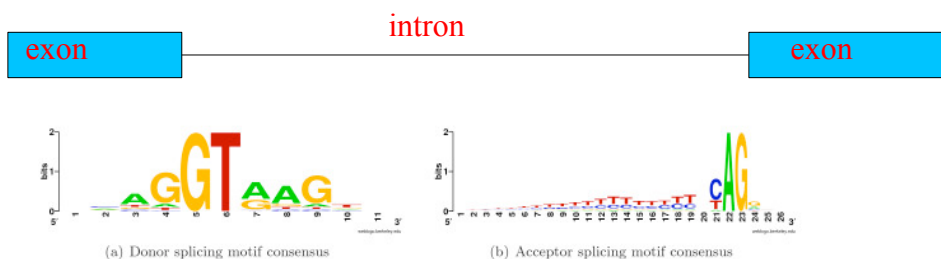
RNAm de eucariontes possui introns e exons.

E existem sinais para o splicing!

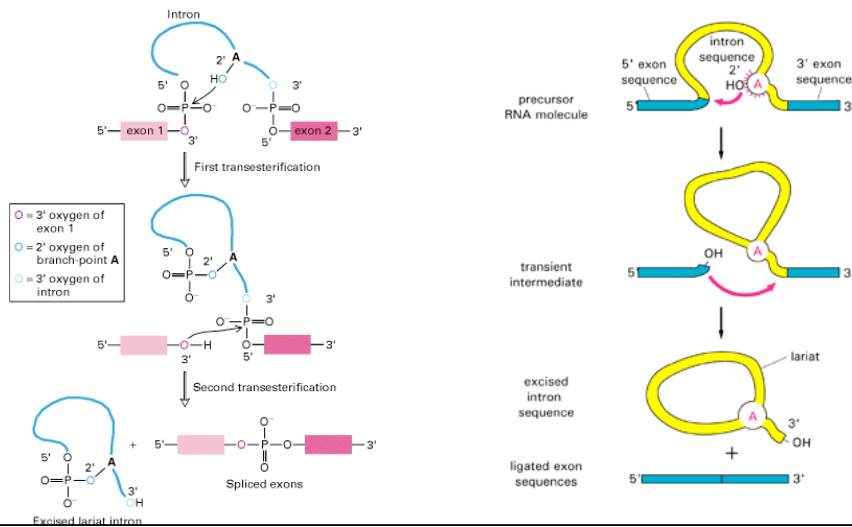
Sinais conservados nos introns:

A 3'do exon

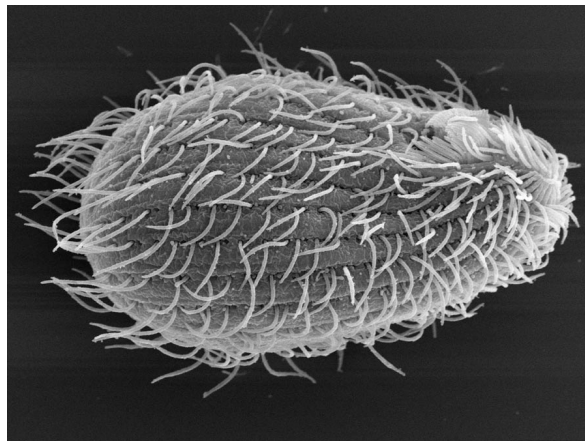
a 5'do exon



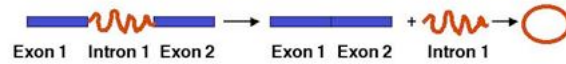
Reações de trans-esterificações resultam na remoção de introns, Na região da Adenina (branch point)- Formação do *lariat*- laço!



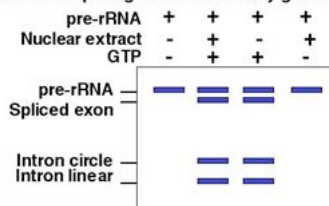
Tom Cechi: trabalhando com o mecanismo de processamento de introns em *Tetrahymena*:



Self-splicing in pre-rRNA in *Tetrahymena* :
T. Cech et al. 1981



• Products of splicing were resolved by gel electrophoresis:

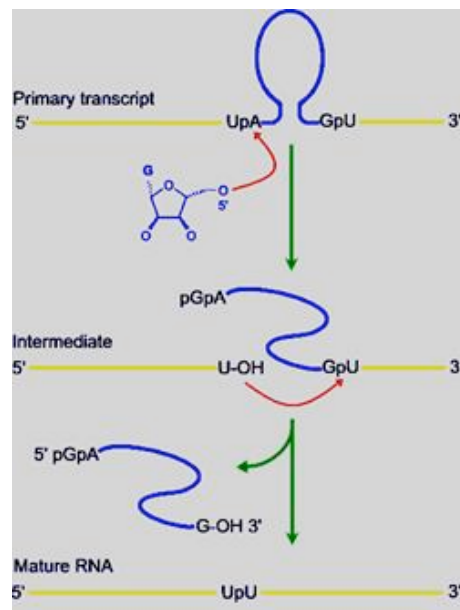


Additional proteins
are NOT needed for
splicing of this pre-
rRNA!

Do need a G
nucleotide (GMP,
GDP, GTP or
Guanosine).

- controle, sem proteínas, teve splicing!!!!
- Self splicing RNA!!!!!!?

Self splicing de RNAr em *Tetrahymena*- grupo I:
RNAs catalíticos= ribozimas!



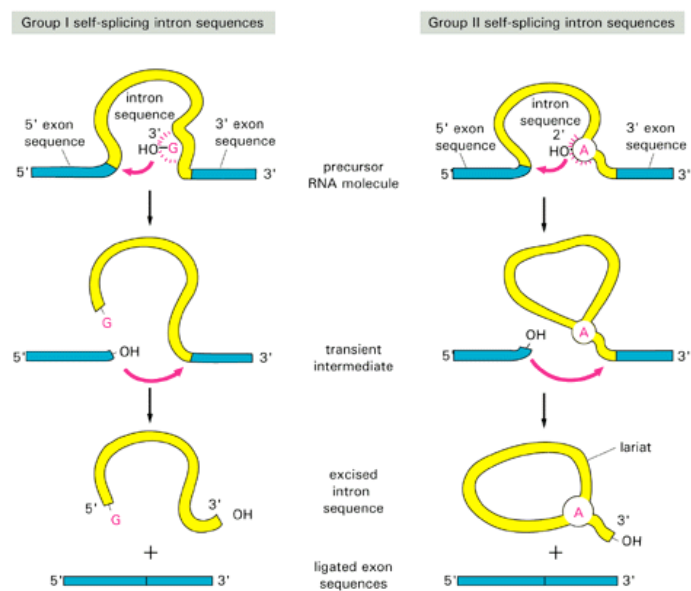
**Self splicing de RNAr em Tetrahymena- grupo I:
RNAs catalíticos= ribozimas!**

Tom Cechi video comments

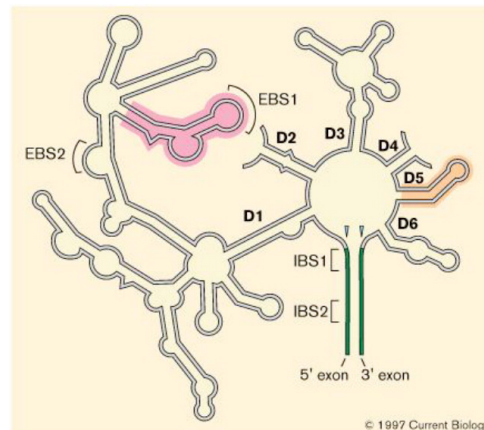
Ribozyme discovery 1 (a partir do minuto 6) and 2

<https://www.youtube.com/watch?v=HwEgcH1zsXw>

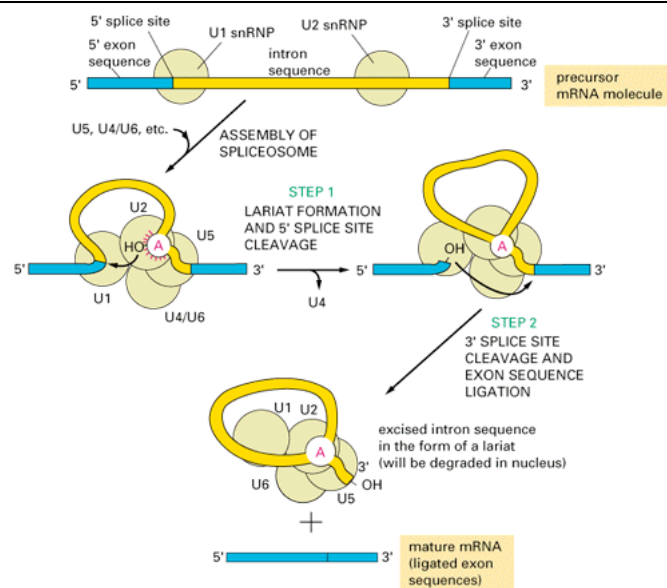
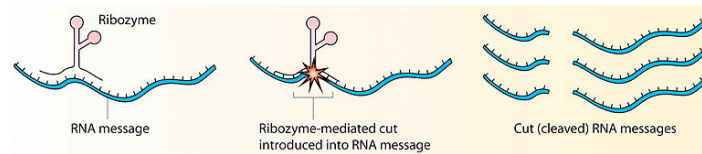
Self splicing grupo I e grupo II:



Os introns (self) têm estrutura que aproximam os exons!

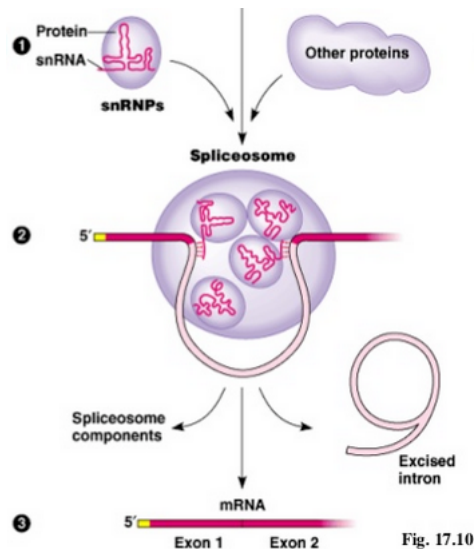


Ribozimas!



Mas em nosso núcleo o splicing ocorre através de spliceossomos!

O Que são snRNPs???? Qual sua composição?????



Os snRNPs são complexos RNA (ricos em U) e proteínas!

Os RNAs emparelham com o RNAm:

Qual a função dos RNAs nessas RNPs! Estrutural ou catálise?

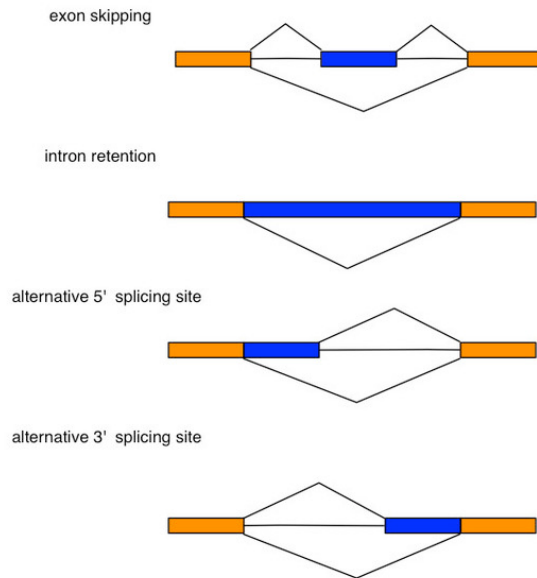
Por que isso é chamado de catálise *trans*?

Que relação existe entre os introns self splicing e aqueles para os spliceossomos?

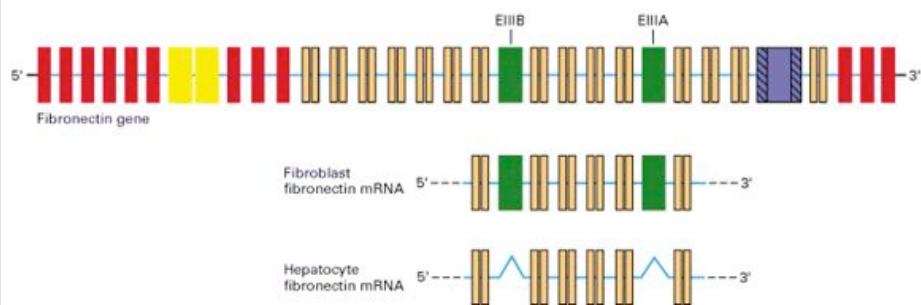
Vídeo snNRPs:

https://www.youtube.com/watch?v=Dp_b9eITxdc

Controle de RNAm Splicing: exon skipping e sítios críticos de splicing!

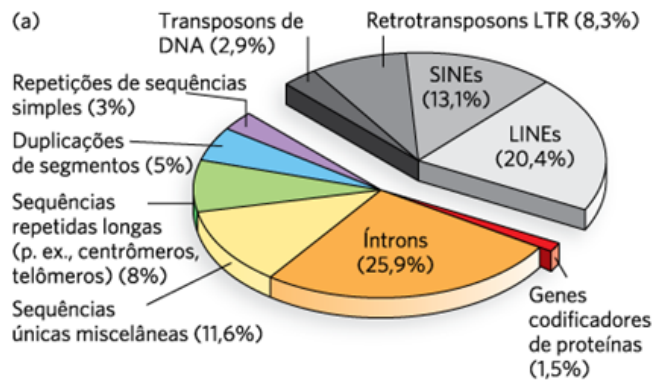


Controle de RNAm Splicing: exon skipping para splicing alternativo na fibronectina:

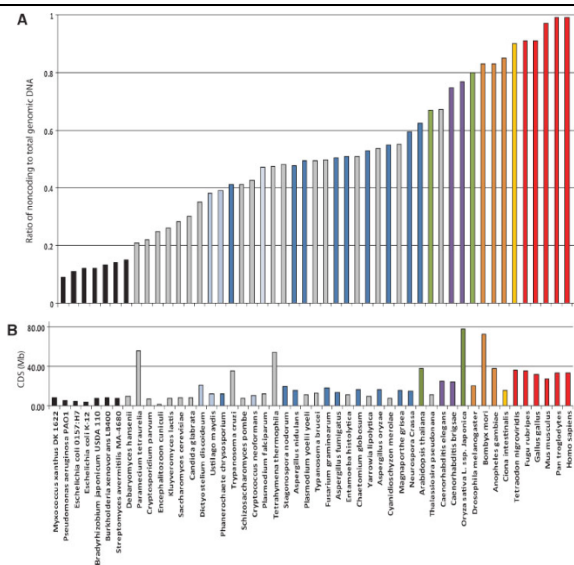


EIIIB e EIIIA são domínios de ligação na membrana plasmática- a produzida pelo hepatócito é uma proteína circulante no sangue....

Composição do genoma humano!



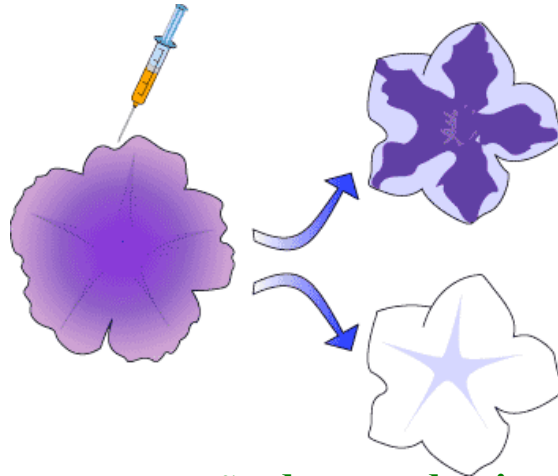
Só 1,5% do genoma codifica proteínas, mas 70% codifica RNA!!!!



RNA não codificante e complexidade de eucariontes!

Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS: **The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity.** *BioEssays* 2007, **29**:288-99.

RNA interference: antes em cossupressão em petúnias



**Superexpressão de gene de pigmento faz a flor
ficar branca!!!**

RNA interference- um novo paradigma *Caenorhabditis elegans*

Video: <https://www.youtube.com/watch?v=zjqLwPgLnV0>



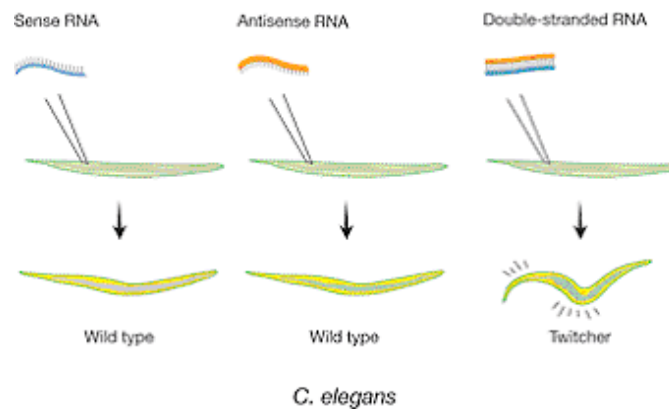
***Caenorhabditis elegans* model for development- see at home:**

<https://www.youtube.com/watch?v=zc1P7lGSzdU>

RNA interference- O experimento (1998)

Silenciamento gênica por RNA dupla-fita.

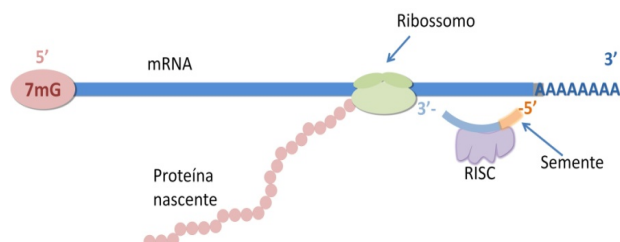
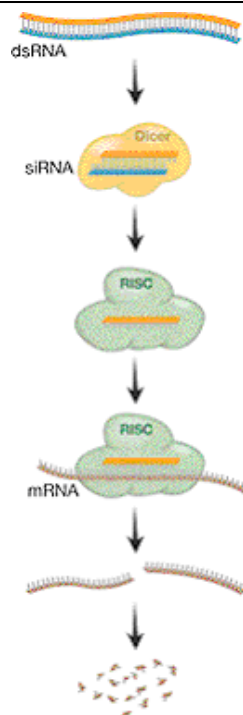
Craig Mello and Andrew
Fire, Nobel- 2006

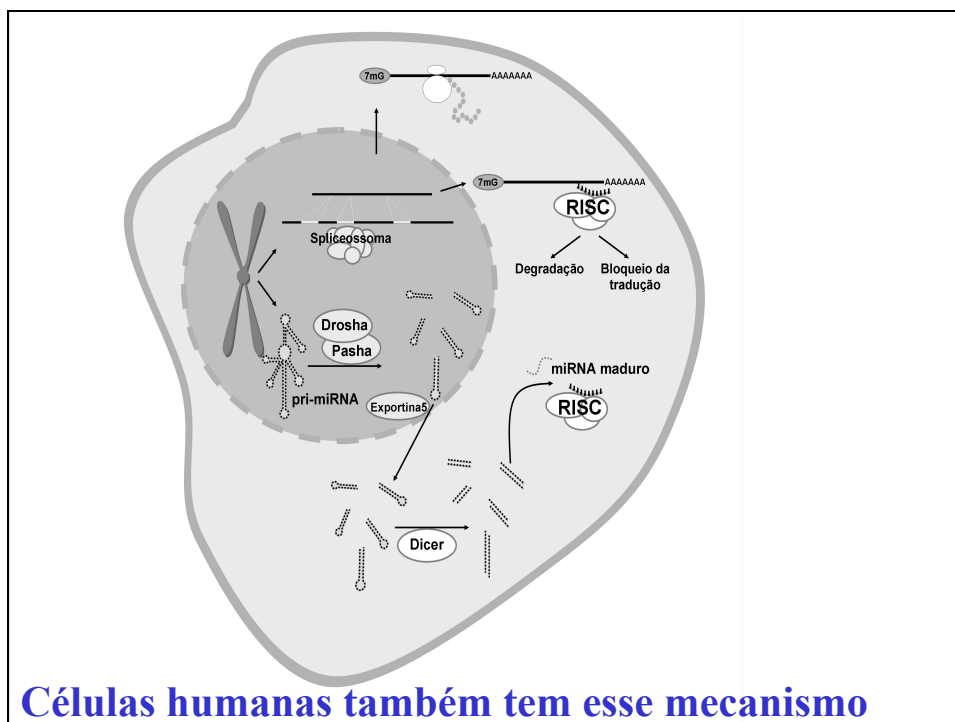
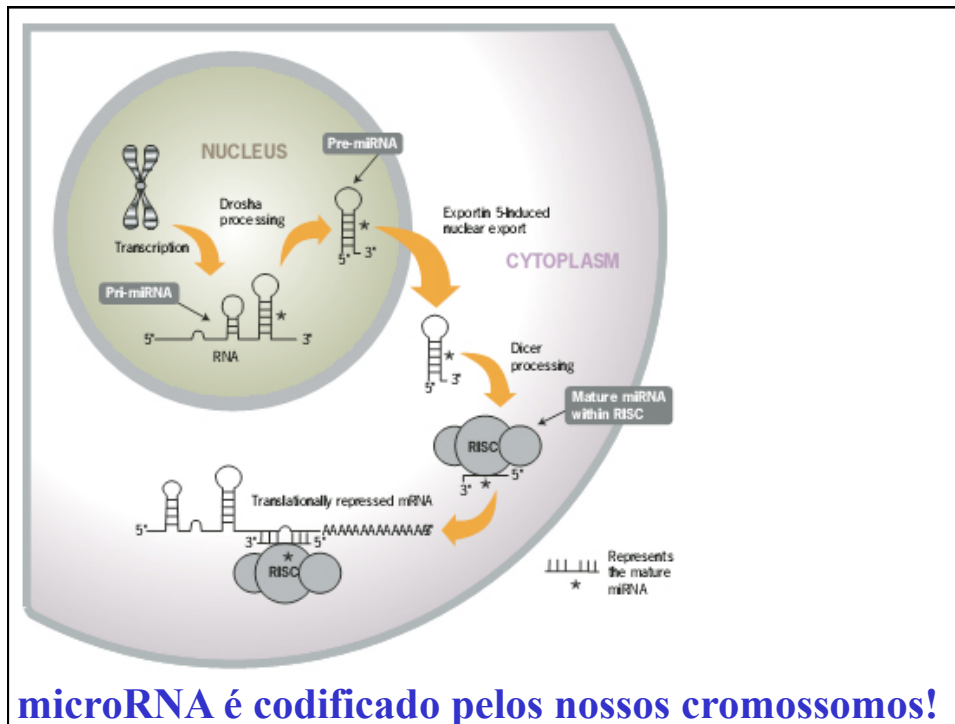


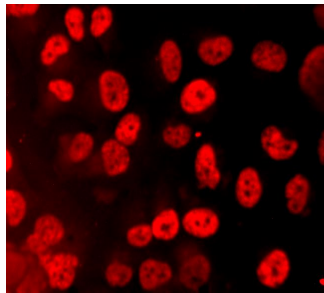
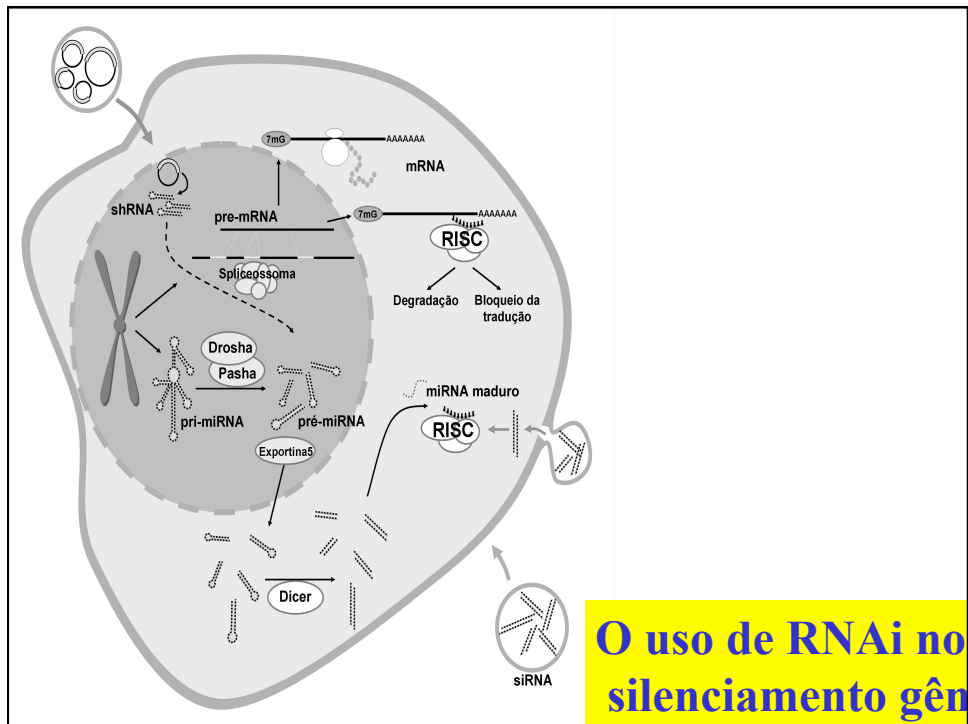
RNA interference

Silenciamento gênica por RNA dupla-fita- degradação do RNAm

Ou bloqueio de tradução

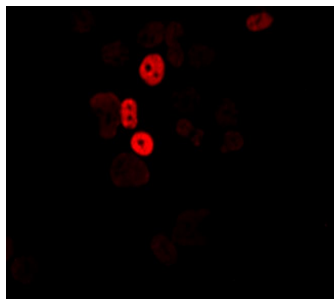






Si RNA –exemplo de inibição de proteína nuclear.

RNA controle



SiRNA silenciando esse gene.

RNA interference Nature video and neuronaute:

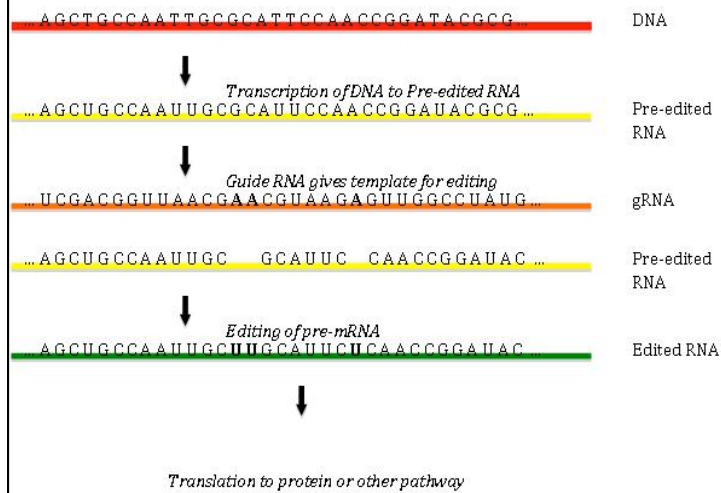
https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGBI_ELE

RNA interference para leigos:

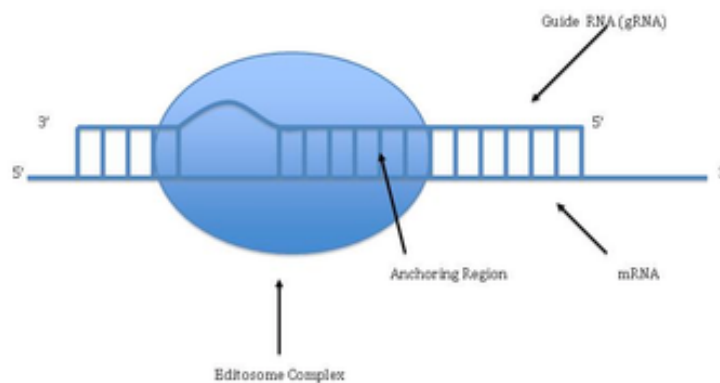
<http://ed.ted.com/lessons/rnai-slicing-dicing-and-serving-your-cells-alex-dainis>

- **Nem sempre a sequência do RNA é igual a de seu gene!!!!**
- **Edição do RNA!!!!**

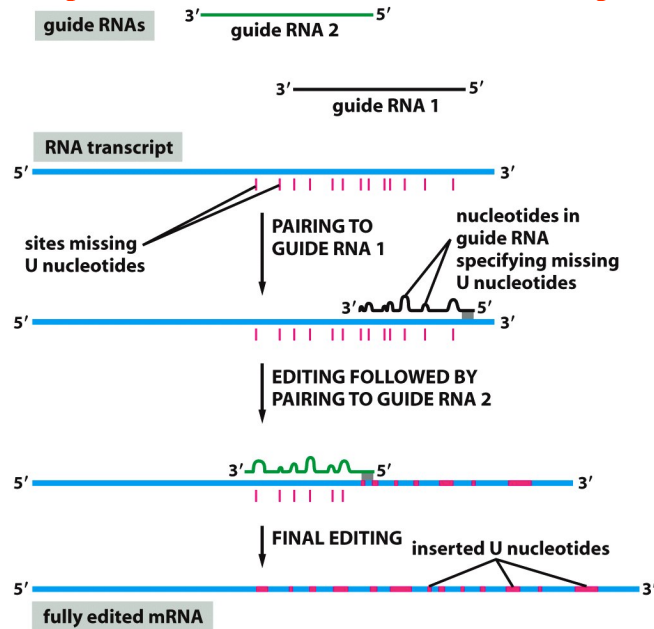
Addition of Uracil to RNA



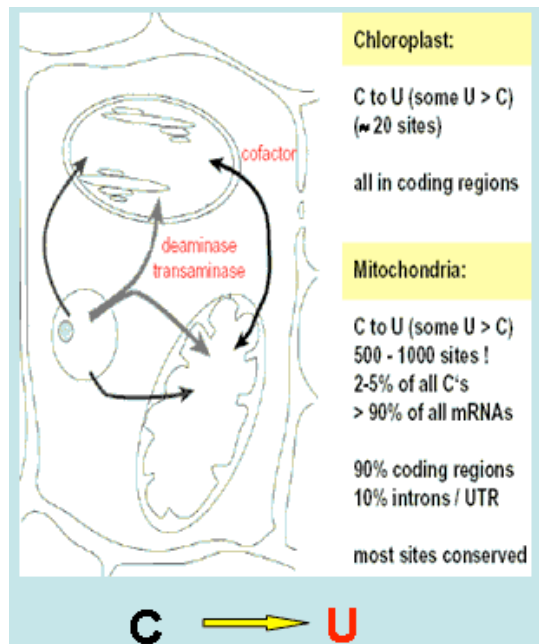
Os RNAs podem ser editados: RNA editing pelo RNA guide!



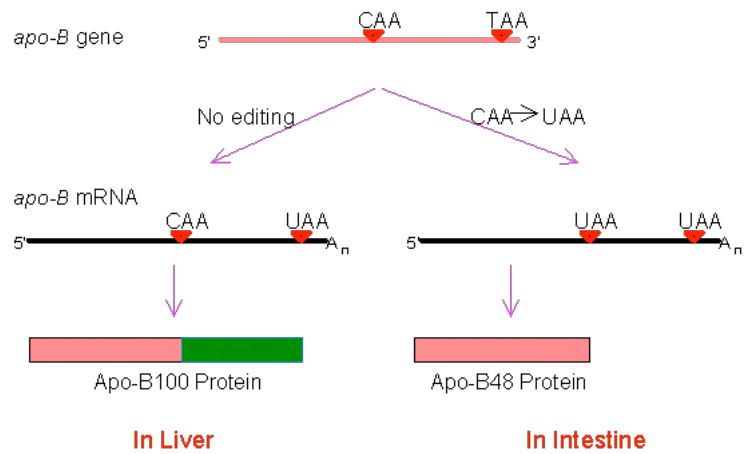
Os RNAs podem ser editados: mitocôndria de tripanossoma!



Os RNAs podem ser editados: organelas de plantas!



RNA editing em humanos!
Expressão diferente dependendo do tecido



PIRATAS DO TIETÊ - Laerte

